

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

A kutatási téma előzményei

Pályázatunk fő célja, hogy négy fő „trófikus” hormonnak (pajzsmirigyhormonok, ösztrogén, leptin és ghrelin) a táplálékfelvétel hypothalamicus szabályozásában játszott szerepét kutassuk, illetve az ezen a téren rendelkezésre álló adatokat kutatási eredményeinkkel érthetőbbé, és a gyakorlati életben használhatóbbá tegyük. A témát a hormonhatások specifikus receptorokra kifejtett önálló-, illetve kombinált befolyásának vizsgálatán keresztül közelítettük meg.

A “trófikus” hormonok és a hypothalamus kapcsolata

A neuroendokrin hypothalamus számos endokrin funkció idegi, illetve integratív központja. Így például, a teljesség igénye nélkül, a reprodukzív folyamatok, és az energiaháztartás szabályozása is hypothalamicus kontroll alatt áll. Utóbbi tulajdonképpen összefoglaló elnevezés és magában foglalja a táplálékfelvételnek, az anyagcsere intenzitásának, zsírdépők képzésének és mobilizálásának és a testhőmérséklet szabályozásának a folyamatait. A felsorolt szabályzó folyamatok külön-külön és együttesen is döntő mértékben határozzák meg a szervezet energiaállapotát és az ettől függő összes biológiai funkciót, azaz alapvetően a homeosztázisnak nevezett belső biológiai egyensúlyt. Ha pedig ehhez hozzávesszük a reprodukzív folyamatok szabályozását is, akkor elmondható, hogy a hypothalamus részt vesz a populáció-szintű biológiai egyensúly fenntartásában is.

A hypothalamus bonyolult működésének feltétele a szabályozott szomatikus területekkel illetve az egyes szomatikus funkciók irányítására specifikált idegrendszeri régiókkal történő folyamatos kommunikáció/egyeztetés. A hypothalamus és a vele kapcsolatban álló szövetek közötti információcsere alapvetően két formában nyilvánul meg: a perifériás szövetekkel humorális úton, a centrális, főleg agyi régiókkal pedig idegi kapcsolatokon keresztül. A humorális úton történő jelzőrendszeren belül kiemelt szerepet játszanak azok a folyamatok, amelyek irányításában, illetve az irányításhoz szükséges reciprok kommunikációban hormonok szolgálnak jelzőanyagként. E rendszerben tehát a hypothalamus centrális endokrin végpontként, míg az egyes, a hypothalamicus hormonok által szabályzott és saját hormontermelésre is képes szervek perifériás endokrin végpontként szerepelnek.

Az endokrin végpontok kapcsolata

Az elmúlt kb. 50-60 év ezirányú kutatásait az jellemezte, hogy a hypothalamus és az egyes perifériás endokrin végpontok (végpontok) kapcsolatát egyenként, azaz nem integratív módon tanulmányozták. Az utóbbi 10-15 év kutatási eredményei azonban tisztázták, hogy a hypothalamus integrált szabályzó működése olyan idegi áramköröket működtet, amelyek egymással morfológiai és funkcionális átfedésben is vannak, és ennek következtében a hypothalamus, mint centrális végpont, minden szabályzó működése hatással van az összes, egymástól egyébként fizikailag elkülönült perifériás szervekre. Ez a felismerés tette szükségessé, hogy a perifériás eredetű hormonális jelek hypothalamicus hatásait együttesen vizsgáljuk, ahogy ma már a világ számos kutatóintézetében is teszik.

Jelen pályázatunkban elsősorban hypothalamusra és azokra a perifériás endokrin végpontokra fókuszáltunk, amelyek elsődleges szerepet játszanak a táplálékfelvétel szabályozásában. Így, a gyomor által termelt ghrelin, a zsírsejtek által termelt leptin, a pajzsmirigyhormonok és az ösztrogén (megjegyzés: a petefészekben kívül számos más szövetben is termelődik, és meghatározó szerepet játszik az anyagcserefolyamatok szabályozásában) hypothalamikus

hatásait vizsgáltuk elsősorban, de a hypothalamicus hatások vizsgálatakor elemeztük a pályázatban külön nem feltüntetett inzulin szerepét is.

Ghrelín

A ghrelín egy 28 aminosavból álló orexigén hormon, amelyet először Kojima és munkatársai (1) izoláltak patkány gyomorfalából (a fundus P/D1 sejtjei termelik).

Magzati korban a ghrelín koncentrációja a mérhető szint alatt van, és csak a születés után 2-3 héttel emelkedik meg jelentősen. A keringésben található ghrelín legnagyobb része a gyomorban termelődik, bár a hypothalamus, a hypophysis, a vese és a belek illetve a placenta is képes nagyobb mértékű ghrelínt a keringésbe juttatni. A ghrelín orexigén hormon, tehát a táplálékfelvételt serkenti. Ezt azon idegi körök befolyásolásával éri el, amelyek közvetlenül szabályozzák a táplálékfelvétellel kapcsolatos viselkedést és magát a táplálékfelvételt, valamint az emésztést. Az előzőeken kívül más élettani folyamatokra is hat, amelyek segítségével összességében a szervezet energiaháztartását szabályozza. Így többek között befolyásolja a hőszabályozást, a növekedési hormon (GH) termelését, a sejtosztódást, az apoptózist, az alvás-ébrenlét ciklust illetve a szív és érrendszeri funkciókat.

A legtöbb ghrelínreceptor a hypothalamus nucleus arcuatusában található, ahol az erős étvágyserkentő hatású neuropeptid Y (NPY) és agouti-related protein (AgRP) együttesen termelődik (NPY/AgRP neuronok), de ghrelínreceptor kimutatható a hypothalamus egyéb részein is, továbbá a hypophysisben, illetve a vékony- és a vastagbélben, a placentában, a vesékben, a herékben, a petefészekben, a limfocitákon (főleg B-sejteken) és az inzulintermelő β -sejteken egyaránt.

Közvetlenül az agykamrába juttatott, vagy intravénásan adagolt ghrelín fokozza a táplálékfelvételt, tehát növeli az éhségérzetet, továbbá több kutatócsoport is kimutatta, hogy a hormon segíti a lipogenezist és gátolja a zsírdépők lebontását. A ghrelín képes az HDL (high density lipoprotein) molekulához kötődni, amivel meggátolja, hogy az lipid molekulákat kössön és szállítson, ezzel csökkenti a lipidek elszállítását a szövetekből. A ghrelín növeli a testsúlyt és a zsírraktárakat, tehát elhízáshoz vezet, miközben a szervezet vázrendszere, a csontok növekedése érintetlen marad. Azokban a génmódosított egerekben, melyekben nem termelődik ghrelín, semmilyen vázrendszer-növekedési rendellenességet, test-összetételbeli rendellenességet illetve táplálékfelvétellel kapcsolatos zavart nem lehetett észrevenni. Tehát a ghrelín egy energia-hiányt jelző hormon, amely mégsem fokozza a vázrendszerben található tartalékok mozgósítását.

A ghrelín leadás legerősebb ingere az éhezés (2), amely fokozza a ghrelínszekréció minden paraméterét, beleértve a leadás amplitúdóját is. A vérben keringő hormon koncentrációja éhezéskor emelkedik, táplálékfelvétel után pedig csökken. Már egy viszonylag rövid, például 24 órás éhezés is kiváltja a ghrelínkoncentráció emelkedését, azonban hosszabb távú táplálékmegvonásnak nincs hatása a táplálékfelvétel után mérhető ghrelín koncentrációjára. Ez a jelenség arra utal, hogy a ghrelín főleg a rövidtávú energiahiány esetén termelődik, és ezzel a szervezet megpróbálja visszaállítani a megfelelő energia-egyensúlyt.

A ghrelín fő célpontja a hypothalamusban található nucleus arcuatus NPY/AgRP-pozitív idegsejtjein található receptorok (3, 4). A táplálékfelvétel szabályozása szempontjából a nucleus arcuatusban eddig kétféle idegsejt csoportot azonosítottak. Az egyik csoportba tartoznak a táplálékfelvételt fokozó, orexigén neuronok (éhségsejtek, NPY és AgRP tartalmazó sejtek). A másik csoport tagjai inkább a jóllakottság irányában dolgoznak, azaz anorexigén sejtek. Ezek főleg melanocita-stimuláló hormon/pro-opiomelanokortin (α -MSH/POMC) illetve kokain- és amfetamin által szabályozott transzkriptet (CART) termelik, amelyek a legfontosabb anorexigén faktorok a szervezetben.

Hewson és munkatársai (5) szerint a ghrelín a hatását az NPY leadás serkentésén keresztül fejti ki. Közvetlenül az agykamrába jutott NPY-antagonista alkalmazása esetén csökkenthető a hormon étvágyserkentő hatása, de megjegyzendő, hogy AgRP-antagonista hatású IgG

alkalmazása is hasonló eredménnyel járt. Nakazato és munkatársai (6) szintén leírták, hogy a ghrelin serkentő hatással van az AgRP és NPY mRNS termelésére, de nem befolyásolja a NPY/AgRP neuronoknak az energia-kiadás szabályozására kifejtett hatását. Az előzőekkel összhangban immunhisztokémiai kísérletek is rámutattak a direkt kapcsolatra, mely a NPY/AgRP tartalmú sejtek és a ghrelin-tartalmú rostok között található. Andrews és munkatársai (7) szerint a ghrelin hatása az NPY/AgRP sejtekre a mitokondriális légzés befolyásolása révén alakul ki, valószínűleg úgy, hogy befolyásolja a mitokondriumok osztódását az ún. uncoupling protein 2 (UCP2) molekulán keresztül.

A ghrelin evolúciós szempontból egy stabil molekulának tűnik, ugyanis éppúgy megtalálható emlősökben, mint madarakban, hüllőkben, kétélűekben és halakban, bár a funkciója eltérő lehet az egyes fajokban. Emlősökben a ghrelin serkenti a táplálékfelvételt, csirkében viszont kimutattak egy ellentétes hatást is, miszerint intracerebroventricularis ghrelin adminisztráció csökkenti a táplálékfelvételt (8, 9). Egyéb madár fajokban továbbra sem ismert a ghrelin pontos funkciója, bár valószínűleg ott is az energia-egyensúly és hőtermelés szabályozása tekinthető a fő feladatának, de a hatás mechanizmusa legnagyobb valószínűséggel eltér az emlősökétől.

Leptin

A leptin egy 16 kDa tömegű anorexigén peptid hormon, melyet a zsírsejtek termelnek. Fő szerepe, hogy gátolja a zsírraktárak képződését a szövetekben, befolyásolja a táplálékfelvételt és az energiaegyensúlyt, amivel segíti az élőlény táplálékhiányos időszakokhoz való alkalmazkodását. Az aminosav szekvenciát kódoló génszakaszt Geffroy és munkatársai írták le először 1995-ben (10), akik „*ob*” génnek nevezték el, ugyanis azt vették észre, hogy ennek a génnek a mutációja elhízást (*obesitas*) okoz. A kezdeti bizonyítékok azt mutatták, hogy a leptin szintje összefüggésbe hozható a zsírszövet mennyiségével, ebből arra következtek, hogy maga a fehérzsírszövet termeli a hormont (11). Ma már tudjuk, hogy a fő előállító fehérzsírszövet mellett több szövetféleségben is képződik leptin (12), így a barnazsírszövetben, a méhlepényben, a petefészekben, sőt a vázizomban és a gyomorban (fundus mirigyek epitel sejtjeiben), az emlő epitel sejtjeiben, a szívben, a májban, a csontvelőben és a hypophysisben is termelődhet. Ezekben a szövetekben parakrin és autokrin funkciókat is ellát. Elhízott állatokból származó mintákból nagyobb *ob* mRNS szintézis mutatható ki, illetve a leptin-leadás mértékét a zsírsejtek mérete is befolyásolja, miszerint a nagyobb sejtek több leptint adnak le.

A leptin receptorokat (Ob-R) a *db* gén kódolja (13). *In situ* hibridizációs technikával magas Ob-Rb receptor szintet találtak a hypothalamus és hypophysis sejtjeiben, ami arra utal, hogy főleg ezek az anatómiai régiók a felelősek a leptin hatásáért (14). Ezt az elméletet támasztja alá, hogy egyszeri intracerebroventricularis leptin adagolása már alacsony dózisban is étvágycsökkenést eredményez. A központi idegrendszer mellett a zsírszövetekben, májban és a vázizomban található magasabb szintű Ob-Rb mRNS szintézis, ami arra utal, hogy a leptinnek, a táplálékfelvétel szabályozásán kívül, nagyon fontos szerepe van a perifériás lipidmetabolizmusban is.

Feltételezések szerint a leptin az a típusú leptin receptor (Ob-Ra) segítségével jut át a vér-agy gáton, de a pontos mechanizmus még nem ismert. Feltételezik, hogy Ob-Ra receptorral rendelkező sejtek aktívan képesek eljuttatni a véráramból a leptin molekulákat közvetlenül azokhoz a sejtekhez, amelyek Ob-Rb receptorral rendelkeznek az idegrendszerben.

A leptin centrális hatása nem köthető egyetlen konkrét folyamathoz sem, azt inkább direkt és indirekt mechanizmusok eredője határozza meg. Legáltalánosabb hatása az, hogy az orexigén hatású neurotranszmitterek szintézisét csökkenti, illetve az anorexigén molekulák szintézisét fokozza. A két párhuzamos hatás eredménye a táplálékfelvétel csökkenése. Ez a folyamat nem egyirányú, hanem egy dinamikus egyensúlyt tart fent, ami azt jelenti, hogy nem csak a leptin befolyásolja az orexigén/anorexigén anyagok leadását, hanem ezen anyagok is képesek modulálni a leptin hatását. A közvetlen hatásokon kívül a leptin közvetve is képes befolyásolni a

táplálékfelvételt. Ismert például, hogy a leptin a periférián fokozza a lipolízist, így a vérben megnő a szabad zsírsavak koncentrációja (NEFA). A NEFA szintén képes a központi idegrendszerre hatni, így a leptin közvetlen étvágycsökkentő hatását kiegészíti. A leptin fokozza az UCP-t (uncoupling protein) tartalmazó hypothalamicus neuronokban, illetve feltételezhetően más helyeken is, a mitokondriumokban a hő- és az ATP-termelés szétkapcsoltságát, így fokozza a hőtermelést. A hőtermelés fokozása miatt az energiaegyensúly a negatív irányba mozdul el.

A leptin fő célsejtjei a hypothalamusban az ún. NPY/AgRP neuronok, amelyek a két antagonistá hormon (leptin-ghrelin) kettős szabályozása alatt állnak (15, 16). A két ellentétes hatású hormon interakciója szabályozza az idegsejtek aktivitását, és így a táplálékfelvételt.

Pajzsmirigyhormonok (PMHk)

A PMHk számos élettani folyamatban játszanak meghatározó szerepet, melyek közül jelen pályázat szempontjából elsősorban a táplálékfelvétel szabályozására kifejtett hatásokat foglaljuk össze.

A PMHk közé tartozó molekulák tulajdonképpen jódtartalmú aminosav származékok, melyeket a jódatomok száma és helyzete alapján különböztetünk meg. Míg a prohormonnak tekinthető tiroxinban (T4) négy, addig a biológiailag sokkal aktívabb trijód-tironinban (T3) három jódatom kapcsolódik az aromás gyűrűkhöz. Mindkét hormon átalakulhat reverz trijód-tironinná (rT3), ami szintén 3 jódatomot tartalmaz, illetve dijód-tironinná (T2), ami csak két jódatomot tartalmaz. A két utóbbi molekulát biológiailag inaktívnak tekintik.

A PMHknak kulcsfontosságú szerepük van a szervezet energiaháztartásának fenntartásában. Szabályozzák a metabolikus folyamatokat, az oxigénfogyasztást és a hőtermelést, továbbá nélkülözhetetlenek a normális növekedésben, fejlődésben és szaporodási folyamatokban egyaránt.

Emberben a keringő T3 80%-a nem közvetlenül a pajzsmirigyből szabadul fel, hanem a perifériáról származik, ahol T4-ből alakul át a megfelelő dejodáz enzim hatására. A legjelentősebb T3 előállító szervek a máj, a vese és a vázizom. Patkányok pajzsmirigyében több hormon termelődik (55%), mint a perifériás szervekben (17); madarakban pedig a PMHk 99%-a a periférián szintetizálódik (18).

A pajzsmirigy működésének szabályozása negatív visszacsatoláson alapuló mechanizmus (negatív feedback) révén valósul meg. A hypothalamicus magok egy thyreotropin-releasing hormone (TRH) nevű vegyületet termelnek, mely serkenti a pajzsmirigyserkentő hormon (thyroid-stimulating hormone, TSH) termelését az adenohypophysisben. Az előző folyamat eredményeként megemelkedik a vérplazmában a T4 koncentrációja. A megemelkedett T4 koncentráció gátlólag hat a hypothalamicus magokra, és hatására csökken a TSH termelése, ezáltal pedig a T4 koncentrációja is.

A perifériás T4-T3 átalakulást úgynevezett dejodáz enzimek katalizálják. Három féle dejodáz enzimet különböztetünk meg. Az 1-es típusú dejodáz (D1) patkányokban főleg a központi idegrendszerben, ezen belül is a hypophysisben fejeződik ki. Alacsonyabb rendű gerincesekben, így halak agyában szintén kimutatták a D1-et, emberben viszont a D1 nem található meg.

Emberi agyban eddig egyedül a 2-es típusú dejodáz (D2) kifejeződését sikerült kimutatni. A D2 megtalálható más emlősök, például patkány agyában is (19). Legnagyobb mennyiségben az astrocytákból és a tanycytákból (a mediobasalis hypothalamus közelében) mutatható ki (20, 21).

A 3-as típusú dejodáz (D3) szintén megtalálható a felnőtt patkányok agyában, elsősorban az előagyban, az agykéregben, a hippocampus pyramidalis sejtjeiben, a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben és a piriform cortexben. Az agynak ezen régiói a leggazdagabbak PMH receptorokban. Újszülött patkány agyában a D3 mennyisége korfüggő. A D2-vel ellentétben, D3-at legnagyobb mennyiségben az idegsejtek termelik (22).

A három dejodáz közül a D1 és a D2 aktiválja, míg a D3 inaktiválja a PMHt. (D1 savas kémhatás esetén szintén képes inaktiválni a PMHt). Emlősökben az aktív T3 termeléséért főleg a

D1 a felelős. Az enzim kimutatható a májban, a vesében, a pajzsmirigyben, a vázizomban, a tüdőben és a hypophysisben. Ezek a szervek termelik és juttatják be a véráramba a T3-at.

Az aktív és az inaktív PMH arányát, az aktuális energiaigénynek és az energiakészletnek megfelelően, a deiodáz-aktivitáson keresztül a perifériás szövetek állítják be. A perifériás szövetek deiodáz-aktivitása többé-kevésbé független a központi szabályozástól.

A PMHk specifikus magreceptorokon (PMH-receptorok; Thyroid hormone receptor, TR) keresztül hatnak. A TR-ek bizonyos gének ligandum-függő transzkripcióját szabályozzák, azaz az E2 receptorokhoz hasonlóan ők is transzkripciós faktorok (23, 24). Emlősökből eddig négyféle TR típust mutattak ki: TR α 1-2 és TR β 1-2, melyeket két erősen konzervatív gén kódol (Thra és Thr β). TR α receptort eddig csak emlős fajokban írtak le. A TR-eknek mind T3-függő, mind pedig T3-független funkciója ismert.

A TR α és TR β kifejeződésének mintázata kor- és szövetfüggő. Míg a TR α széles körben előfordul, addig a TR β 1-2 mRNS kifejeződése a specifikus ontogenetikus állapotokra korlátozódik, és nagyfokú szövetspecifitást mutat. Knock-out és knock-in kísérletekben azt találták, hogy a TR α hatással van a szív működésre, a hőszabályozásra, a vérsejtképződésre, az emésztőrendszer és a csontokérésére. A TR β viszont elengedhetetlen a hormonháztartás, valamint az érzékszervi funkciók megfelelő működéséhez, mint a hallás, a látás és a tapintás. TR α és TR β izoformák együtt is képesek ugyanabban a szövetben megjelenni, és bizonyos mértékben egymás feladatát is képesek ellátni (25, 26).

A felszívódott táplálóanyagok a *vena portae*-n keresztül rövid idő alatt a májba kerülnek, ahol befolyásolják a deiodázok termelődését. A szénhidrátok és kisebb mértékben a fehérjék fokozzák a hepatikus D1 gén kifejeződését, miközben csökkentik a D3 aktivitását. Evés közben a májba jutó táplálóanyagok élettani mértékben megemelik a vérben keringő T3 koncentrációt, ami a hypothalamus ventromedialis magján keresztül fokozza az étvágyat. Tehát az evés a T3 hormon segítségével egy öngerjesztő folyamatban fokozza az éhségérzetet.

A T3 koncentrációjának megemelkedése elsősorban a tápanyag energiatartalmától függ, és viszonylag független a vér glükóztartalmától. Ugyanakkor az éheztetés a T3 koncentrációjának csökkenését idézi elő. Az éhezésre a szervezet a T4 koncentrációjának megemelésével válaszol, ezen a téren azonban jelentős faji különbségek figyelhetők meg.

Kísérleti eredmények alapján (rágcsálók, főemlősök) általánosan elmondható, hogy a T3 a hypothalamusban található orexigén neuronok (neuropeptid Y/Agouti-related protein, NPY/AgRP neuronok) aktiválása révén váltja ki a táplálékfölvételt. A T3 ezekre a sejtekre a leptinnel és a grelinnel együttesen hat. Coppola és mtsai (27) egyértelműen bizonyították, hogy a nucleus arcuatus NPY/AgRP neuronjai a hypothalamicus tanycytakon keresztül jutnak a T3-hoz.

Ösztrogén (E2)

Az E2 elsősorban a petefészekben és a fejlődő tüszőkben termelődik, de a szervezetben máshol, többek között a zsírszövetben és az agyban is szintetizálódik. A zsírszövetben szintetizálódott E2 a plazma E2 koncentrációjához is jelentősen hozzájárul. A zsírszöveten kívül jelentős aromatáz (E2-szintetáz) aktivitás figyelhető meg az izomban, a bőr fibroblast sejtjeiben, az osteoblastokban és a csontok osteocytaiban, a vascularis endotélben és az aorta simaizom sejtjeiben, a Leidig-sejtekben, valamint az agy számos területén, így a medialis preopticus areában, a hypothalamus rostralis-mediobasalis régiójában és az amygdalában. Az ösztrogének majdnem minden sejt típusra hatnak, elsősorban szabályozó és trófikus funkciójuk van.

Hímivarúakban az E2-re jellemző szabályozás a tesztoszteron aromatizációja révén valósul meg, amelynek elsődleges, petefészek-független forrása a zsírszövet. Újabb kutatások eredményeként az is kiderült, hogy az agy is képes prekursorokból neurosteroidokat, köztük E2-t is előállítani.

Korábban az E2-t a fő női nemi hormonnak tekintették, amely a hypothalamicus idegsejtekre hat, és szinaptikus átrendeződést, valamint a hypothalamicus neuronális kapcsolatok átrendeződését indukálja, ezúton alapvető szerepet játszik a GnRH-felszabadulás szabályozásában és következőképpen az agyalapi mirigy luteinizáló hormonjának elválasztásában. Megjegyzendő, hogy a synapticus plaszticitás fontos szerepet játszik a leptin valamint a grelin hatásának hypothalamicus közvetítésében is (28), illetve úgy tűnik, hogy ezen hormonokkal együttesen váltja ki a hypothalamus synapticus átrendeződését. Feltételezéseink szerint az E2 önmagában is képes synaptogen hatás kiváltására a hypothalamusban, minthogy az aktuális plazmaszintje a petefészek ciklusát és az éhségérzet kialakulását egyaránt befolyásolja.

Az E2 úgynevezett trófikus hormonként is ismert (azaz a sejtek és szövetek fejlődését szabályozza), valamint az energiaháztartást és az éhségérzet kialakulását egy igen komplex mechanizmuson keresztül befolyásolja. A morfológiai és immunhisztokémiai tanulmányok arra utalnak, hogy a hypothalamusban lévő hormonális interakciók alapja egyrészt az idegsejtek összetett, az E2-re, leptinre, grelinre és a pajzsmirigyhormonokra vonatkozó érzékenysége és reaktivitása, másrészt pedig a hypothalamicus neurotransmitterek, neuropeptidek és neuronális enzimek eloszlásának speciális mintázata.

A szaporodási folyamatok neuroendokrin szabályozása, illetve a táplálékfelvétel és a testhőmérséklet szabályozása az érintett szabályozó neuronok tekintetében nagyfokú átfedést mutat.

Ezen funkciók összehangolása feedback mechanizmusokon alapul, amelyek afferens-efferens jelei a hypothalamo-hypophysealis tengely végpontjainál felszabaduló perifériás hormonok. A perifériás humorális jelek eljutnak a hypothalamus sejtjeinek megfelelő receptoraihoz és különböző inter- és intracelluláris jelzőrendszereket aktiválnak: ez a hypothalamus specifikus, összetett szabályozó működésének az alapja.

Kísérletes megközelítés

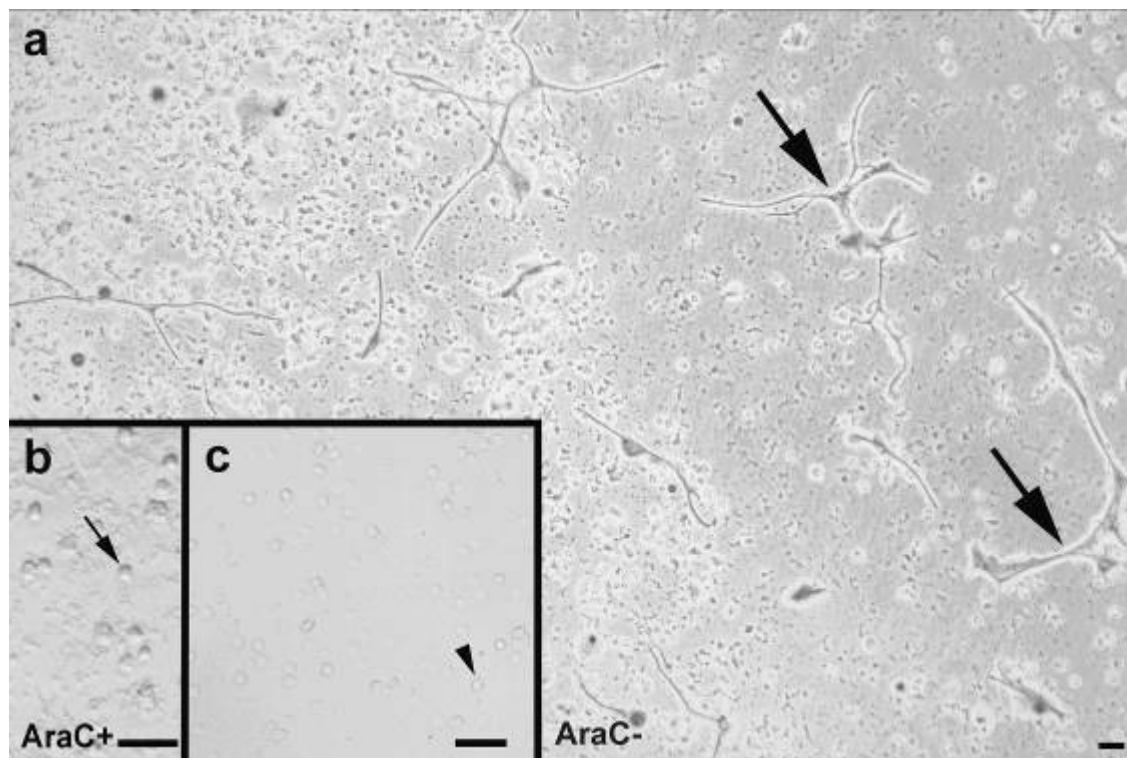
A fentiekben részletezett kutatási előzmények és tudományos háttér után jelen pályázatunkban arra vállalkoztunk, hogy a felsorolt trófikus hormonok legfőbb hatásmechanizmusát tanulmányozzuk, és az eredményeket integratív szemlélettel interpretáljuk. A hormonok, köztük az általunk vizsgáltak is, ma már számos ismert mechanizmuson keresztül képesek kifejteni celluláris hatásaikat. Így pl. a legismertebb mechanizmusok a hormonok specifikus receptorain keresztül, génaktiválást, de plazmamembránba épült ligandumköti domének aktiválását és ezt követő intracelluláris kaskádrendszerek működtetését is magukba foglalják. Mi a jelen pályázatban arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen módon szabályozzák az egyes hormonok önmagukban, illetve különféle kombinációkban (lásd később) az ő specifikus receptorainak expresszióját transzkripciós és transzlációs szinten. Kísérleti módszereink a pályázatban leírtak szerint mind in vitro, mind pedig in vivo módszereket felöleltek (lásd a pályázatban részleteiben is megadott kísérleti módszertant).

OTKA támogatással elért eredmények

Jelen pályázat eredményeiről célszerűnek tartottuk két külön szempont szerint beszámolni: **I)** Összefoglaljuk azokat az eredményeket, amelyeket folyóiratban és/vagy konferencián már publikáltunk; **II)** A még feldolgozás alatt álló adatok-eredmények (amelyek publikálása még folyamatban van, illetve ezután következik) alapján integrált szemlélettel összesítjük és interpretáljuk az eredményeinket.

I) Az eddig publikált eredményeink (29-33) javarészt in vitro kísérleti körülményekből származnak, és a PMHk és az E2 saját és egymás specifikus receptoraira kifejtett individuális és

kombinált hatásait jellemzik. A kísérleti módszertan követte a pályázatban leírtakat, azzal a technikai kiegészítéssel, hogy minimális metodikai módosítással az in vitro mintákból származó PCR és Western blot eredményeket közvetlenül is összehasonlíthatóvá tettük in situ minták eredményeivel. E módosítással az eredményeinket annyival is értékesebbé tettük, hogy számszerű formában mutathattuk be a sejtenyészetekből (1. Ábra) származó eredmények élettani relevanciáját.

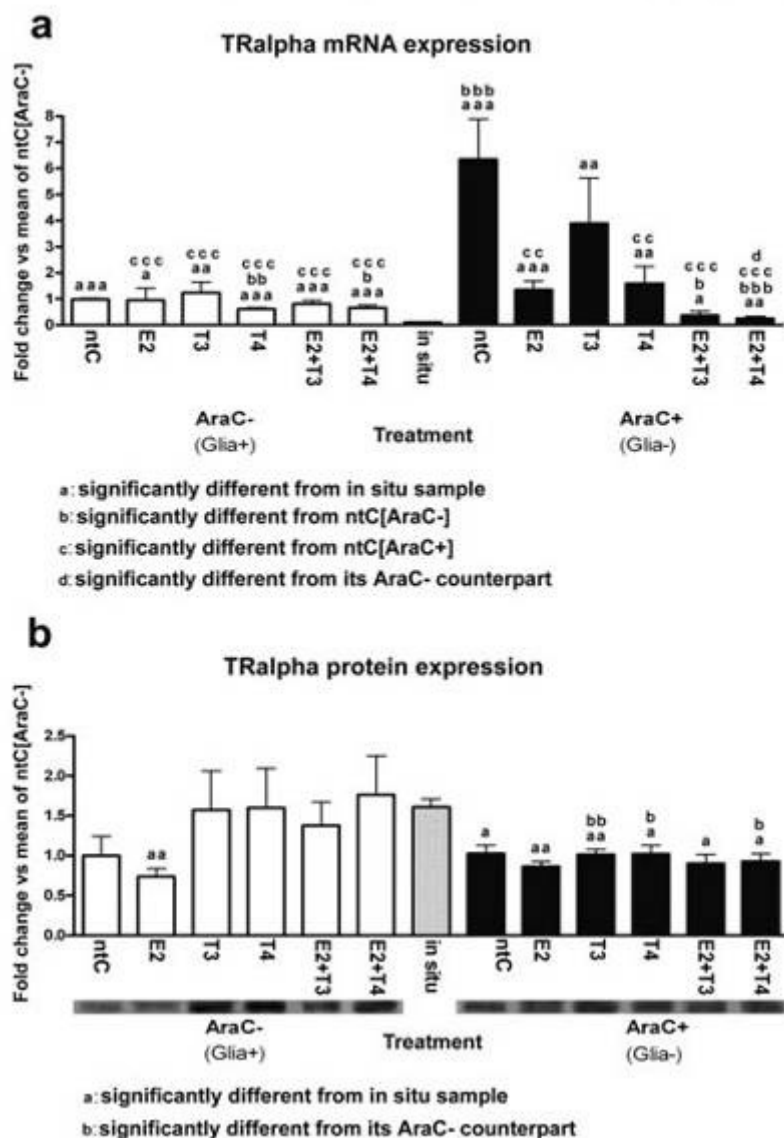


1. Ábra. GFAP (glial fibrillary acidic protein) immunhisztokémiai azonosítása primér kisagyi sejt kultúrában. **a:** Azon tenyészetek, amelyeket nem kezeltünk cytosine β -D-arabinofuranoside-dal (AraC-), GFAP-immunoreaktív gliasejteket tartalmaztak (nyilak). **b:** A negatív kontrol kísérletekben a primér ellenanyag kihagyása sikertelen GFAP-jelölést eredményezett (AraC+). A kis nyíl egy szemcsesejtet mutat. **c:** A cytosine β -D-arabinofuranoside-dal kezelt (AraC+) kultúrák elhanyagolhatóan kisszámú, elszórtan elhelyezkedő GFAP-pozitív sejtet tartalmaztak, amelyek nyúlványokat nem növesztettek, de glia-eredetüket a GFAP-pozitivitás jelezte. Mérték: 50 μ m.

A következőkben bemutatjuk az egyes vizsgált hormonoknak a PMH receptorokra (PMHR, alfa és béta; az ábrákon thyroid hormone receptors, TRs, 2-3. Ábra) és E2 receptor-bétára (ERb, 4. Ábra) kifejtett szabályozhatásokra vonatkozó eredményeinket.

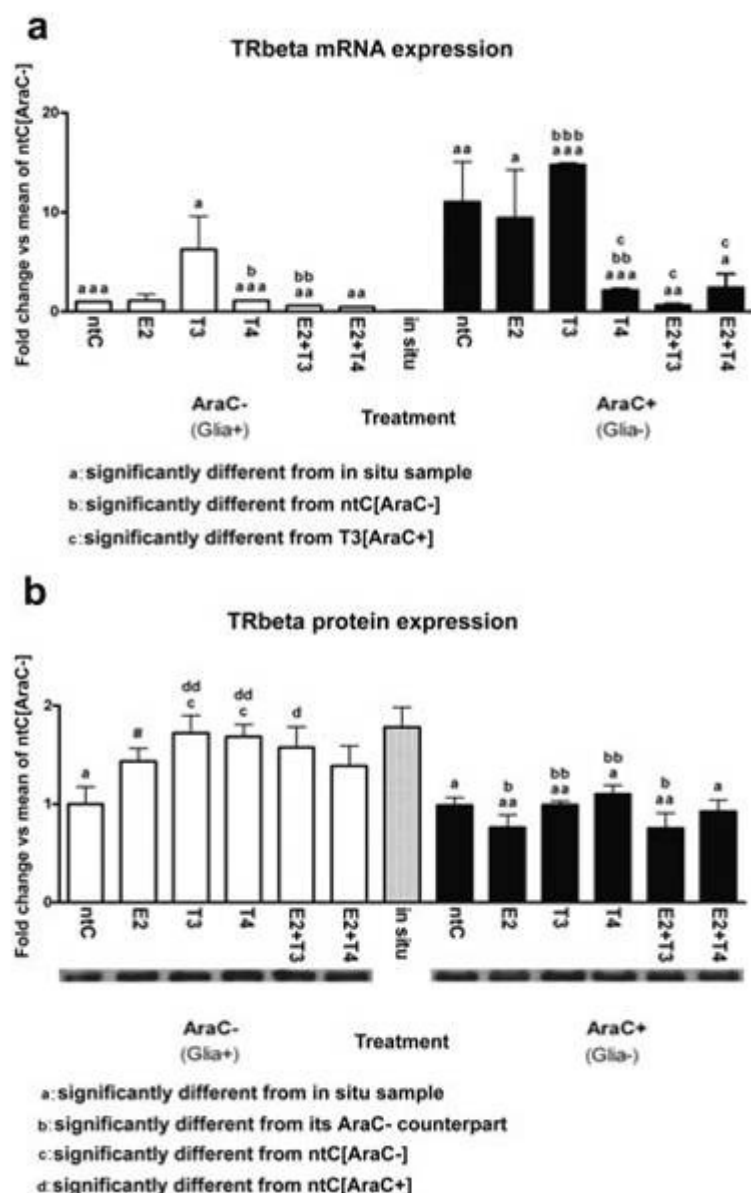
PMHRalfa (TRa)

TRalpha mRNA and protein expression levels after hormone treatments in the presence (AraC-) or absence of glia (AraC+)



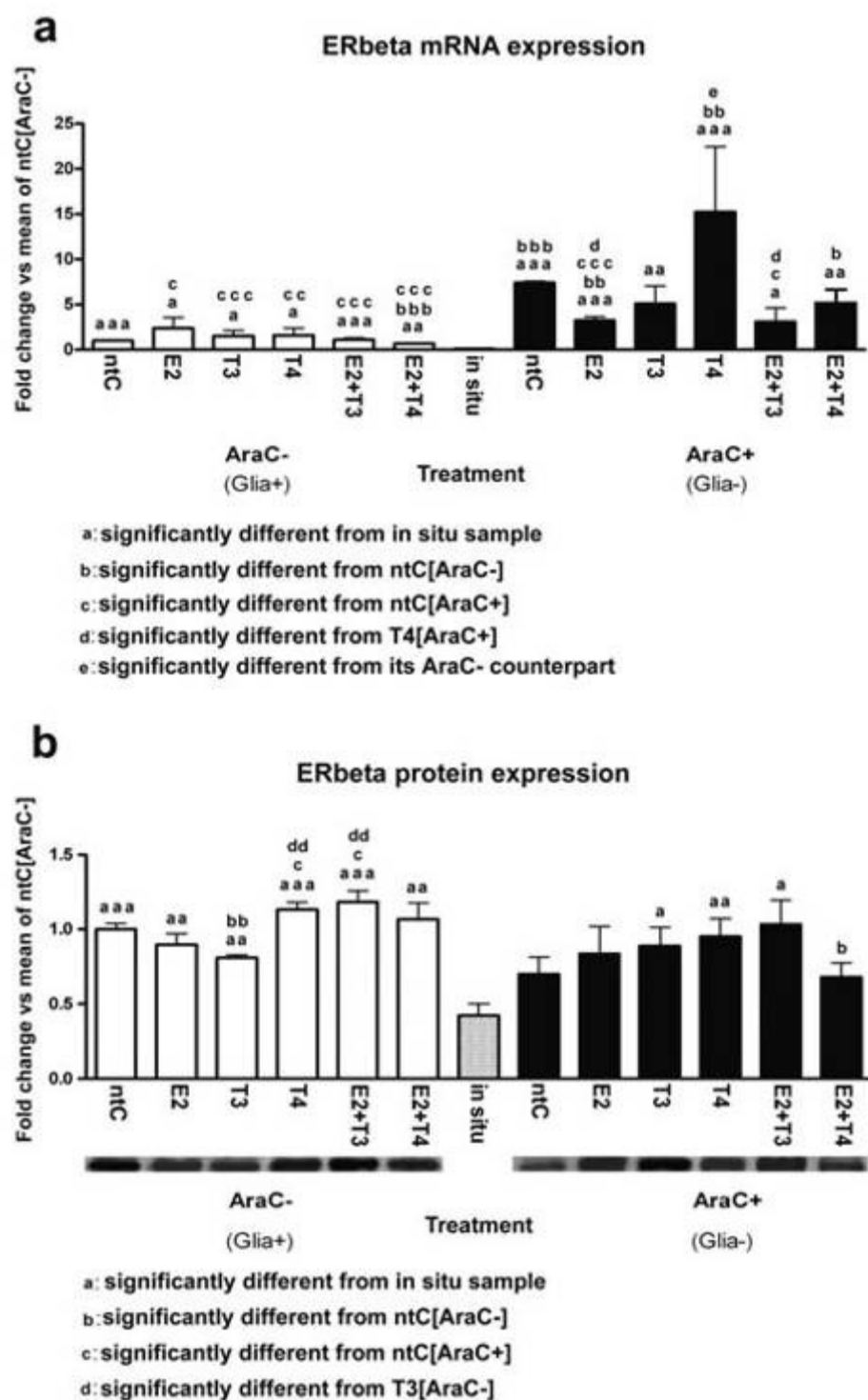
2. Ábra. TRa mRNS és fehérje hormonkezelést követő expresszió szintjei glia jelenlétében (AraC-) és hiányában (AraC+). **a:** TRa mRNS expresszió. A TRa mRNS- és TRa fehérje expressziók mintázata jelentősen eltért egymástól. Minden AraC+/- mintában szignifikánsan magasabb TRa mRNS szintet mértünk, mint az *in situ* kontrollokban. **b:** TRa fehérje expresszió. Általánosságban, az AraC- mintákban, a TRa fehérje expresszió megegyezett az *in situ* eredményekkel. E2-kezelés hatására azonban a TR szintekben, az *in situ* eredményekhez képest szignifikáns csökkenés volt tapasztalható. Az AraC+ mintákban, ahol a glia növekedését és szaporodását gátoltuk, a TRa szignifikánsan csökkent az *in situ*-hoz képest. Rövidítések (2-4 Ábrákon): ntC: nem kezelt kontroll; E2: ösztrogén; T3: triiodothyronine; T4: thyroxine; AraC+: cytosine β -D-arabinofuranoside-dal kezelve; AraC-: cytosine β -D-arabinofuranoside-dal nem kezelve. Szignifikancia szintek: egy betű, ha $p < 0.05$; két betű, ha $p < 0.01$; három betű, ha $p < 0.001$.

TRbeta mRNA and protein expression levels after hormone treatments in the presence (AraC-) or absence of glia (AraC+)



3. Ábra. . TRb mRNS és fehérje hormonkezelést követő expresszió szintjei glia jelenlétében (AraC-) és hiányában (AraC+). **a:** TRb mRNS expresszió. Ahogyan a TRa mRNS esetében, úgy a TRb mRNS expresszió szintje is minden esetben magasabb volt, mint az *in situ* kontrollok esetében. A qPCR és Western blot eredmények összehasonlítása rávilágított, hogy a TRa-hoz hasonlóan a TRb mRNS[AraC+] értékek magasabbak voltak, míg a TRb fehérje[AraC+] értékek alacsonyabbak voltak, mint a megfelelő *in situ* szintek. **b:** TRb fehérje expresszió. Ahogyan a TRa-nál, az átlagos TRb fehérje expresszió szint az AraC- csoportban az *in situ* minták szintjéhez állt közel, mindazonáltal a nem kezelt AraC- kontrollokban szignifikánsan alacsonyabb TRb protein szintet mértünk. Minden hormon kezelés az AraC- csoport magasabb TRb szintjét eredményezte, mint amit a nem kezelt AraC+ kontrollokban találtunk (az E2+T4[AraC-] kivételével, ahol a különbség nem ért el szignifikáns szintet). Minden AraC+ csoportban szignifikánsan alacsonyabb TRb expressziót mértünk, mint az *in situ* mintákban.

ERbeta mRNA and protein expression levels after hormone treatments in the presence (AraC-) or absence of glia (AraC+)



4. Ábra. . ERb mRNS és fehérje hormonkezelést követő expresszió szintjei glia jelenlétében (AraC-) és hiányában (AraC+). ERb mRNS expresszió. A PCR és Western blot eredmények összehasonlítása rávilágított, hogy miközben a tenyésztett sejtek a számukra új kísérletes körülményekhez alkalmazkodtak, mind az ERb mRNS, mind pedig fehérje expressziójuk magasabb lett, mint az *in situ* kontrolloké.

Fontos itt megjegyeznünk, hogy az *in situ* adatok, amelyek a kiültetett sejtekkel azonos korú állatokból származtak, olyan összehasonlítási alapul szolgáltak, ahol a mintavételkor a szöveti integritás és a sejtkörnyezet teljesen intakt volt. Ehhez képest az AraC+/- kultúrákban a szöveti integritás megszűnt, továbbá az AraC+ kultúrákban a gliát elroncsoltuk; Az E2 csoportokban PMH hiány állt fenn, a T3/T4 csoportokban E2 hiány volt, és a nem kezelt AraC+/- kontrollok E2 és PMH hiányosak is voltak (tisztában vagyunk azzal, hogy az ilyen elemzés meglehetősen leegyszerűsített, minthogy a felsoroltakon kívül számtalan egyéb valós különbség is van az *in situ* és *in vitro* biológiai anyagok között).

A fent ábrázolt eredmények a következő fő pontokba csoportosítható jelentéssel bírnak:

- A szöveti integritás elvesztése intenzívebb E2 és PMH funkciót eredményez, valószínűleg annak érdekében, hogy a sejtek a lehető legjobban alkalmazkodjanak az új környezetükhöz, és hogy a lehető legéletképesebbek maradjanak.
- A TRa,b mRNS[AraC-] vs TRa,b mRNS[AraC+] és protein[AraC-] vs. protein[AraC+] közötti jellegzetes különbségek arra utalnak, hogy a glia kulcsszerepet játszik a neuronális TRa,b protein bioszintézisben, minthogy a normálisnál magasabb TRa,b mRNS expresszió a normálisnál alacsonyabb TRa,b protein szinttel párosult a glia hiányában.
- Az ERb gén transzkripciójának és transzlációjának kiegyensúlyozottsága kevésbé glia-függő, mint a TRa géneké.
- Az AraC- csoportban a szöveti integritás elvesztésekor csak jelentősen emelkedett transzkripciós aktivitással tartható fenn az *in situ*-ra jellemző TRa,b fehérje expresszió szint (az E2[AraC-] csoport kivételével). PMH hiányos állapotban viszont (E2 kezelés) még a megemelkedett transzkripció sem tudott az *in situ* mintákban mért TRa fehérje szintet eredményezni.

TRa

Eredményeink alapján világossá vált, hogy a glia szerepe az eredmények alakításában az alkalmazott hormontól függ. Mindazonáltal, általános glia-hatás nem volt tapasztalható PMH-hiányos állapotban (E2[AraC-]), minthogy a TRa protein expresszió az E2[AraC+/-] csoportokban egyaránt az *in situ* szint alatt maradt. Ez arra utal, hogy a TRa fehérje expresszió tekintetében a glia a PMHk, és nem az E2 hatását mediálja, azaz amikor a glia jelen van, a TRa protein expresszió a PMHkon, és nem az E2-n múlik. A vizsgált glia sejtek, T4-T3 konverziós képességüknél fogva képesek a neuronok számára T3-t prezentálni. Emellett megjegyzendő, hogy a „főlős” T3-t a neuronokban lévő 3-as típusú deiodáz enzim deaktiválja. Annak érdekében, hogy az idegsejt időnként deaktiválja a T3-t, a glia gátolni tudja a neuronális 3-as deiodáz aktivitását. Ez az idegsejtek és glia közötti interaktív mechanizmus lehet az alapja annak, hogy a TRa,b[AraC+/-] protein expresszió közel azonos volt. Ha az idegsejtek E2/PMH hiányos, vagy csak E2 hiányos állapotban voltak, ez nem eredményezte a normál TRa protein expresszió szignifikáns megváltozását, bár a középértékek valamelyest csökkentek. Ha azonban a glia működés kiesett (ntC[AraC+]), az előbbi csökkenés szignifikáns szintet ért el, és meglehetősen magas, és erősen variábilis mRNS szintekkel párosult. Utóbbi kezeléstől függő variabilitás mutatja, hogyan próbálnak az idegsejtek viszonylag egyenletes, bár a normálisnál alacsonyabb TRa protein szintet fenntartani a glia hiányában. Összességében, a középértékek tanúsága szerint glia hiányában a TRa mRNS [AraC+] inkább függ az E2-től, mint a PMHk-tól. Ezen túl, a középértékekben mutatkozó nagyfokú variabilitás azt mutatja, hogy azon idegsejtek, amelyek gliamentes környezetben vannak, transzkripciós szinten nagyfokú alkalmazkodó képességgel bírnak annak érdekében, hogy egy relatíve kiegyensúlyozott TRa,b fehérjeszintet tartsanak fenn.

TRb

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a normál TRb protein expresszió fenntartása a glia által mediált folyamatokon múlik. Glia jelenlétében (AraC- csoportok), csak a PMH-kezelt csoportokban volt mérhető in situ-hoz hasonló TRb protein expresszió. Az E2[AraC+/-] csoportok összehasonlítása alapján megállapítható volt, hogy a glia mind az E2, mind pedig a PMH hatásokat mediálja.

A TRa-hoz hasonlóan, a TRb fehérje értékek mögött is jelentősen emelkedett mRNS szintek álltak.

ERb

Talán a legszembeszökőbb eredmény az ERb mRNS és fehérjeszintek in situ-hoz képest egyaránt megemelkedett szintje. Ez a jelenség arra utal, hogy a szöveti integritás elvesztése az ERb mind transzkripció, mind transláció szintű megemelkedését indukálja, mégpedig a glia jelenlététől vagy hiányától függetlenül. Véleményünk szerint, amit irodalmi adatok is alátámasztanak, ez a tenyésztett neuronoknak egy reparatív/regeneratív válaszreakciója lehet a vitalitásuk lehető legmagasabb szinten tartása érdekében (34, 35). A ligandum-függő TR- és ER transzkripció eredmények tekintetében több hasonlóság is megfigyelhető. Például, a glia jelenlétében a középértékek közelebb álltak egymáshoz, mint a glia-mentes közegben. Ezen kívül, egyértelmű különbségeket lehetett tapasztalni a hasonlóan kezelt glia mentes és gliát is tartalmazó csoportok értékeinek nagysága és variabilitása között is, ami egyértelműen mutatja a glia szerepét a neuronális ERb gén transzkripció terén. Másrészt viszont a vizsgált idegsejtek az ERb transzkripció szinten nagyfokú alkalmazkodóképességet mutattak, valószínűleg annak érdekében, hogy az alkalmazott kísérletes körülményeknek megfelelő legoptimálisabb ERb fehérje szintet ki tudják alakítani.

Szintén fontos és érdekes megfigyelésünk, hogy míg az AraC- vs. AraC+ ER β mRNS értékek meglehetősen különböző mintázatot mutattak (ezáltal jelentős glia hatást jelezve) az ERb transzkripció terén, az AraC- és AraC+ ER β protein expresszió értékek sokkal kevésbé különböztek egymástól. Ez arra utal, hogy a neuronok fentemlített alkalmazkodó képessége egyben tompíthatja a glia esetlegesen kieső működéséből fakadó tüneteket. Ez a gondolat azonban felveti a kérdést, hogy mi is a glia konkrét szerepe a neuronális ERb (és TRa,b) expressziójának szabályozásában, tekintettel arra, hogy az ERb (és TRa,b) protein expressziós szintek nem mutatnak egyértelmű glia-szabályzó szerepet. ERb-t a neuronokban és a gliában egyaránt kimutattak (36, 37), ennél fogva ésszerűnek tűnik feltételezni, hogy azon mechanizmusok, amelyek az ERb expressziót az adott körülményekhez igazítják, mindkét sejttypusban megtalálhatók. Ez a feltételezés nem zárja ki a glia-neuron interakciók lehetőségét annak érdekében, hogy mindkét sejttypus jelenléte esetén, azaz fiziológiai helyzetben, a két sejttypus egymással szinkronban alakíthassa a körülmények által megkívánt ERb bioszintézisének intenzitását.

II. Az összesített eredmények interpretálása

Mint korábban említettük, a ghrelinre és leptinre vonatkozó eredményeink még elemzés alatt vannak, így publikálásukra is csak a közeljövőben kerül majd sor. Ezért reméljük, hogy az eddigi összesített eredmények alapján kielégítő módon tudjuk interpretálni az egyes hormonális kölcsönhatásokat, természetesen figyelembe véve az erre vonatkozó szakirodalmi adatokat is (38-41).

Az ösztrogén és pajzsmirigyhormonok közti interakciók

A klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a pajzsmirigy rendellenességek és az inzulin érzékenység gyakrabban fordul elő az idősebb női korosztályban, mint a férfiakban. Ennek pontos oka, illetve a PMHk és a nemi hormonok hatása közötti összefüggés még nem teljesen tisztázott. Menopauzát követően azoknál a nőknél, akik E2 kezelésben részesültek, alacsonyabb

szabad T3 és T4 koncentráció mellett is fenntartható a szérumban normál TSH koncentrációja (42). Normál pajzsmirigy működésű, illetve hypothyroid patkányok esetén az E2 kezelésnek nincs hatása a szérumban TSH koncentrációjára. Azonban amikor a hypothyroid patkányok az E2 kezelés mellett T3-at is kapnak, a TSH koncentrációja megemelkedik. Feltételezhető, hogy az E2 kezelés befolyásolja a TR kifejeződését a hypophysisben. Úgy tűnik tehát, hogy a nemi hormonok hatására az agyalapi mirigy thyreotrop sejtjei érzékenyebbé válnak a PMHkra.

A PMHk az energiaháztartás szabályozásán túl szerepet játszanak a fotoperiodicitás kialakításában, illetve befolyásolják a szexuális viselkedést hívekben és nőstényekben egyaránt. A PMHk és a nemi hormonok egyaránt szabályozzák az energia homeosztázist és az alapanyagcserét, megfelelő membrán illetve magreceptorokon keresztül. Ezek a mechanizmusok negatív visszacsatolás révén szabályozódnak a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengelyen, a hypothalamus-hypophysis-gonad tengelyen, valamint az ún. "hypothalamus-bél" körforgáson keresztül. Emellett a PMHk hozzájárulnak a nem reprodukzív folyamatok fenntartásához madarakban és emlősökben egyaránt. Így például a mitokondriumok, az endoplazmatics reticulum, a plazmamembrán, a synapsisok megfelelő működését, a lipogenezis, a lipolízis, a termogenezis, a növekedés, a fejlődés, a differenciáció, és a mielinizáció folyamatait szabályozzák. A fent említett hatásokon kívül a PMHk és az E2 is jelentősen befolyásolják a nők kedélyállapotát, amely alapjául szolgál a táplálkozási magatartás kialakulásának, és amelyek szignalizációs útvai a hypothalamicus magokban futnak össze. Ilyen mechanizmus lehet például az egyes ER és TR izotípusok közötti átfedés, mely az egyes receptorok genomikus kifejeződésében nyilvánul meg. Csábító lehet ezen a ponton azt feltételezni, hogy az E2 és PMH receptorok funkciója között is átfedés található, azonban ezen receptorok ko-lokalizációja azt mutatja, hogy különböző, egymással nem átfedő funkciókkal rendelkeznek. Ezeket az eredményeket támogatják a knock-out kísérletek is, melyek szerint az egyes izotípusok külön, specifikus funkciókkal rendelkeznek. Másrészt azonban lennie kell egy olyan mechanizmusnak, mely az E2 és PMH együttes jelenlétét dolgozza fel, és az így kialakuló közös jelek befolyásolják az alapvető élettani funkciókat, mint például az éhségérzetet, az önkéntes takarmányfelvétel és a homeosztázis.

Mind az E2, mind pedig a PMH receptorokat ligand-függő transzkripciós faktoroknak tekintik, melyek a megfelelő nukleotid szekvenciánál a saját HRE-ihez (HRE, hormone response element) képesek kapcsolódni. E szekvenciák bizonyos szakaszokon identitást mutatnak (identical half site AGGTCA), ami, legalábbis elvileg, lehetőséget biztosíthat mindkét hormon típus, mint ligandum kötődésére. Az azonos szekvencia ellenére a receptorok közti átfedés nem jellemző. Ismert például, hogy hibás TR α 1 gátolni képes az E2 hatását anélkül, hogy a AGGTCA szekvenciához kapcsolódott volna (43). Azok a tanulmányok, melyek a TR α 1 E2-re kifejtett gátló hatását írják le, azt sugallják, hogy az EREk és TREk együttműködve ligandum-függő és izotípus specifikus módon befolyásolják az E2 hatására kialakuló génexpressziót. A TR α -val ellentétben a TR β 1 illetve TR β 2 nem képes teljesen gátolni az E2 hatását, de ezek a receptorok is jelentősen csökkentik az E2-mediált transzkripciós aktivitást. Tehát úgy tűnik, hogy az egyes E2 és a PMH receptorok egyaránt rendelkeznek egy hasonló központi DNS-kötő résszel, amivel promotor részekhez kapcsolódnak, így képesek komplexen modulálni a transzkripciót.

Ismert, hogy a T3-ra reagáló DNS elemek közel felénél a DNS szekvencia megegyezik az ún. „estrogen responsive element” (ERE) szekvenciájával, tehát PMH receptorok is képesek lehetnek egyes ERE-hez kapcsolódni. Ez megfigyelhető például egyes hypothalamicus receptorok kifejeződéséért felelős gének esetében. A táplálékfelvétel hypothalamicus szabályozása tekintetében fontos lehet, hogy patkányokból származó hypothalamicus sejtmagkivonatból egyaránt kimutatható mind a pajzsmirigyhormon-, mind az ösztrogénreceptor, illetve mindkét receptor típus képes lehet a preproenkefalin gén promóterszakaszához kötődni. Ezért úgy gondolják, hogy a két receptor típus együttesen, egymás hatását befolyásolva hat a preproenkefalin kifejeződésére (44, 45). Az oxitocinreceptor promoter szakasza is olyan HRE szekvenciával rendelkezik, melyhez több, a magreceptorok szupercsaládjába tartozó receptor

képes kapcsolódni, így itt is valószínű, hogy a PMH befolyásolja az E2 hatására kialakuló oxitocin mRNS kifejeződést, és az oxitocinnal összefüggő viselkedést. A progeszteronreceptor, mely fontos a szaporodással kapcsolatos viselkedés szabályozásában, illetve a normál női ciklus során megjelenő étvágy emelkedéséért is felelős, olyan promotor régióval rendelkezik, melynek ERE szakaszához a megfelelő ligandum megkötése után szintén kötődhet PMH receptor (46). Úgy tűnik tehát, hogy a PMHk tompíthatják az E2-függő szexuális viselkedési mintákat, mégpedig a hypothalamicus magokban található speciális receptorokon keresztül. Ugyanígy valószínűsíthető, hogy a két hormonreceptor típus interakciója révén szabályozódik a táplálékfelvétellel kapcsolatos viselkedés is.

Az utóbbi 30 évben rengeteg cikk foglalkozott a PMHk és E2 interakciójával. Ma már általánosan elfogadott álláspont, hogy genomikus hatásuk révén a két hormonsalád együttesen aktiválni vagy éppen elnyomni képes egyes gének kifejeződését, illetve, hogy az egyes hormonok nem genomikus úton, különböző membránreceptorokon, és intracelluláris jelátvivő utakon is képesek befolyásolni a sejtek működését. Patkányok reprodukív viselkedésének vizsgálatával (pl. lordózis-tartás) kimutatták, hogy a nemihormon-függő hypothalamicus gén-kifejeződést és a viselkedést olyan synapticus „inputok” alakítják ki, melyeket az E2 receptorral összefüggő neuroendokrin funkciók befolyásolnak. Például a TR α 1 és TR β -t kódoló géneknek ellentétes hatása van a női nemi viselkedés szabályozásában. A TR α 1 a ventromedialis hypothalamusban (VMH) gátolja az E2-szenzitív géneket kifejező hypothalamicus egyes neuronokat (például preproenkefalin-tartalmú idegsejtek), de nem befolyásolja azt az amygdalában és a putamenben. Ösztrogénnel kezelt, ovariectomizált egerekben a magas dóziszú PMH kezelés csökkenti a lordózis viselkedés kialakulását. Az E2 önmagában emeli az hypophysealis RNS szintézist, de a T3 csökkenteni képes az E2 hatását. Azok a kutatások, melyek a két nem közti különbségeket vizsgálják a hypophysisben, kimutatták, hogy nőstényekben ovariectomia után szignifikánsan csökkent az agyalapi mirigy tömege, illetve az össz celluláris RNS szintje, hímekben viszont éppen ellenkezőleg, a gonadectomiát követően a hypophysis tömege és az RNS szintek is növekedtek. Ösztrogénkezelés hatására azonban szignifikánsan emelkedett a hypophysealis RNS-szint az ovariectomizált nőstényekben (a gonadectomizált hímekre nem volt hatással), egyidejű T3 adagolás gátolta az ösztrogén hatására kialakuló RNS emelkedést.

A PMH receptorokról ismert, hogy képesek kötődni az ERE-hez, így gátolni tudják az E2-függő transzaktivációt (47). A reprodukív funkciókat és a viselkedést szabályozó agyi területek szerepet játszhatnak az éhségérzettel kapcsolatos viselkedések szabályozásában is, például a táplálék felkutatásában vagy magának az éhség érzésének kialakításában. Ilyen agyi területek például a bulbus olfactorius, hippocampus, vagy a cerebellum granularis rétege, ahol a TR α 1 és TR α 2 szintje a legmagasabb.

Összefoglalva, az E2 receptorok és a PMH receptorok együttesen képesek aktiválni illetve szuppresszálni célzott génszakaszokat, bár ismert, hogy az egyes hormonok egyéb, membránhoz kötött receptorral is rendelkeznek, melyek nem genomiális mechanizmusokat indítanak el, például ioncsatornák, intracelluláris Ca²⁺ csatornák aktiválása, vagy G-proteinhez kapcsolt intracelluláris kaszkád folyamatok beindítása.

Ghrelin és leptin interakciók

Emlősökben a ghrelin serkenti a táplálékfelvételt, és ezzel a leptin funkcionális antagonistájának tekinthető. A ghrelin fokozza a laterális hypothalamicus területen és a nucleus arcuatusban a táplálék felvételéért felelős neuronok aktivitását. A leptinnel ellentétben a ghrelin koncentrációja a vérben, a táplálékfelvétellel szoros összefüggésben, folyamatosan változik. Elhízott egyedekben az alacsony ghrelinkoncentráció általában alacsony növekedési hormon, illetve magas leptin koncentrációval társul.

A két hormon között egy kényes egyensúly áll fenn, amelyet először Giovambattista és munkatársai írtak le (48), amikor egy kísérletben tartós ghrelinadagolás után emelkedett leptinszekréciót találtak. Később azt is kimutatták, hogy enyhe hiperleptinaemia (emelkedett leptinkoncentráció a vérben), vagy leptin adagolás csökkenti a rövid éheztetés után keletkező ghrelin koncentrációemelkedést a vérben. Rigamonti és munkatársai magasabb ghrelin koncentrációt találtak fiatal egyedekben, mint idősebb egyedekben (49), ebből következtetve lehetséges, hogy a magas leptin szint elnyomja a ghrelin plazmaszintjét. Ezzel összefüggésben lehet az a megfigyelés is, miszerint az elhízott egyedekben mérhető leptin szint magas, éhezés esetén csökkent illetve anorexia nervosa esetén meglehetősen alacsony ghrelin szint mérhető.

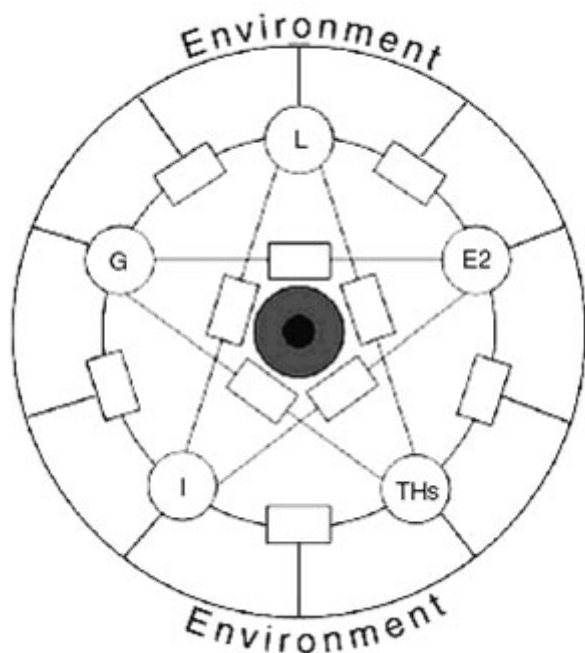
A táplálékfelvétel szabályozásán kívül e hormonok képesek befolyásolni az alvás-ébrenlét ciklust is. Nem megfelelő vagy kevés alvás esetében megváltozik a két hormon koncentrációja, és ez az energiaháztartás zavarát okozza, ami végül elhízáshoz vezet. Élettani esetben a ghrelin szintje éjszaka megemelkedik, ezzel ellentétben alvászavarok esetén az éjszakai ghrelin koncentráció alacsonyabb marad, amit megemelkedett nappali koncentráció követ.

A fent említett interakciók jól magyarázhatók a hypothalamicus leptin/ghrelin-érzékeny neuronok anatómiájával és a szinapszisok felépítésével. Horvath kimutatta, hogy a hypothalamusban található neuronok és neuron körök képesek átszerveződni egyes perifériás hormonok hatására (50). Mind a leptinnek mind a ghrelinnek fontos szerepe van a hypothalamus (idegi, szinaptikus) plaszticitásának szabályozásában, főleg az NPY/AgRP illetve a POMC sejteken, amelyek kulcsfontosságúak a táplálékfelvétel és energiaegyensúly szabályozásában. A ghrelin fő célsejtjei a laterális hypothalamusban található orexin tartalmú idegsejtek, amelyek közvetlenül idegzik be a raphe-ban található szerotoninerg neuronokat, amik fontos szerepet játszanak az alvás és ébrenlét ciklus szabályozásában. Emelkedett ghrelin koncentráció fokozza a serkentő synapsisok számát, így a serkentő/gátló synapsisok arányát emeli a hypothalamusban, főleg a táplálékfelvétel serkentésért felelős nucleus arcuatusban található NPY/AgRP sejteken. Ugyanez a hatás figyelhető meg párhuzamosan a POMC sejteken, ahol főleg gátló synapsisok száma növekszik. Ezzel a synapticus plaszticitással magyarázható a leptin és ghrelin ellentétes hatása. Megjegyzendő, hogy mindemellett ezt a mechanizmust egyéb hormonok, például az ösztrogén és a pajzsmirigyhormonok is befolyásolják.

Eredményeinket további, elsősorban az inzulinnal kapcsolatos hormon interakciók formájában a fentieknél részletesebben tárgyaljuk a közeljövőben benyújtandó publikációinkban.

Végezetül, eredményeink összesített kiértékelése alapján az 5. Ábrában foglaljuk össze a vizsgált trófikus hormonok interaktív hatásait.

5. Ábra. A leptin (L), ghrelin (G), ösztrogén (E”), inzulin (I) és pajzsmirigyhormonok (THs) interakcióinak összefoglalója. A hypothalamus (fekete) a táplálékfelvétel neuroendokrin szabályozásának központja, míg funkcionálisnak hozzákapcsolt agyi területek (sötétszürke) befolyást gyakorolnak a hypothalamicus funkciókra. A felsorolt hormonok, mint feedback jelek, befolyásolják a saját, és egymás szekretálásának hypothalamicus szabályozását, és egyidejűleg az általuk megcélzott perifériás szervek (világosszürke) működését is szabályozzák, egyrészt közvetlenül, másrészt pedig hormonális interakciókon keresztül. A perifériás szervek, a belső és külső környezetükkel való interakciójuk során (legkülső kör), a hypothalamicus szabályozás kellő hangolása érdekében modulálják a hypothalamus felé irányuló humorális feedback faktorokat.



További célok

A jelen pályázat kísérleteinek egyenes folytatását képezi a már elnyert 104982-es OTKA pályázatunk, amelynek keretében azt kívánjuk megvizsgálni, hogy a jelen pályázatban leírt hormon-kölcsönhatások milyen irányban változnak meg egyes környezeti endokrin-hatású anyagok (endokrin diszruptorok) hatására. Reményeink szerint a napjainkban tapasztalható nagymértékű környezetszennyezés, beleértve a kikerülhetetlenül az állati és emberi szervezetbe kerülő endokrin diszruptorok hatásait is, összevetve a tervbe vett kísérletek eredményeivel sikerül bizonyos tartós és populációkat érintő endokrin alapú anyagcsere- és reprodukív zavarok környezeti szennyezésből adódó hátterére rávilágítani.

Referenciák (a témához kapcsolódó saját közlemények vastag sorszámmal)

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.*, 1999. 402:656–660.
2. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, et al.: Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.*, 2001. 24, RC19–RC21.
3. Wren AM, Small CJ, Ward HL, et al.: The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.*, 2000. 141:4325–4328.
4. Holst B, Schwartz TW.: Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 2004. 25:113–117.
5. Hewson AK, Dickson SL.: Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J. Neuroendocrinol.*, 2000. 12:1047–1049.
6. Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al.: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.*, 2001. 409:194–198.
7. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingfors N, et al.: UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature.*, 2008. 454:846–851.

8. Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, et al.: Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci. Lett.*, 2001. 301:123–126.
9. Kaiya H, Furuse M, Miyazato M, et al.: Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2009. 163:33–38.
10. Geffroy S, De Vos P, Staels B, et al.: Localization of the human ob gene to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.*, 1995. 28:603–604.
11. Attele AS, Shi ZQ, Yuan CS.: Leptin, gut, and food intake. *Biochem. Pharmacol.*, 2002. 63:1579–1583.
12. Soukas A, Cohen P, Socci ND, et al.: Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes. Dev.*, 2000. 14:963–980.
13. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al.: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.*, 1995. 83:1263–1271.
14. Fei H, Okano HJ, Li C, et al.: Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997. 94:7001–7005.
15. Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW.: Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm. Metab. Res.*, 1999. 31:345–350.
16. Mizuno TM, Mobbs CV.: Hypothalamic agouti related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology.*, 1999. 140:814–817.
17. Hulbert AJ.: Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2000. 75:519–631.
18. Darras VM, Verhoelst CH, et al.: Thyroid hormone deiodination in birds. *Thyroid.*, 2006. 16:25–35.
19. Bianco AC, Salvatore D, et al.: Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.*, 2002. 23:38–89.
20. Danforth EJR, Burger AG.: The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu. Rev. Nutr.*, 1989. 9:201–227.
21. Tu HM, Kim SW, et al.: Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology.*, 1997. 138:3359–3368.
22. Tu HM, Legradi G, et al.: Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology.*, 1999. 140:784–790.
23. Brent GA, Moore DD, Larsen PR.: Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu. Rev. Physiol.*, 1991. 53:17–35.
24. Sap J, De Magistris L, et al.: A major thyroid hormone response element in the third intron of the rat growth hormone gene. *EMBO J.*, 1990. 9, 887–896.
25. Forrest D, Erway LC, et al.: Thyroid hormone receptor b is essential for development of auditory function. *Nat. Genet.*, 1996. 13:354–357.
26. Gothe S, Wang Z, et al.: Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary–thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.*, 1999. 13:1329–1341.
27. Coppola A, Liu WZ, et al.: A central thermogenic- like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell. Metab.*, 2007. 5:21–33.
28. Horvath, T. L.: The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat. Neurosci.*, 2005. 8:561–565.
29. Scalise TJ, Györfy A, Tóth I, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A: Ligand-induced changes in Oestrogen and thyroid hormone receptor expression in the developing rat cerebellum: A comparative quantitative PCR and Western blot study. *Acta Vet Hung.*, 2012. 60:263–284.

30. Györffy A, Somogyi V, Kiss DS, Bartha T, Frenyó VL, Zsarnovszky A.: Interactive hormonal regulation of cerebellar estrogen- and thyroid hormone receptor expression in primary cerebellar granule cell culture. International Conference on Animal Physiology, Czech Republik, Valtice, 2010.
31. Györffy A, Somogyi V, Kiss DS, Bartha T, Frenyó VL, Zsarnovszky A: Investigating nuclear receptor expression in primary cerebellar granule cell culture: a pilot study. IBRO International Workshop, Hungary, Pécs, 2010.
32. Toth I, Johnson TS, Györffy A, Kiss DS, Somogyi V, Goszleth G, Bartha T, Frenyó LV, Zsarnovszky A: Comparative analysis and functional implications of ligand dependent changes in estrogen- and thyroid hormone receptor expression in the developing cerebellum. MITT 13. Konferencia, Budapest, 2011.
33. Zsarnovszky A, Toth I, Johnson TS, Somogyi V, Györffy A, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyó VL.: Ösztrogén- és pajzsmirigyhormon receptorok transzkripció és transzláció szintű, ligand-függő expressziójának analízise. MÉT 75. Vándorgyűlése, Pécs, 2011.
34. Lee SJ, McEwen BS.: Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001. 41:569–591.
35. Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A, Belcher SM.: Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.*, 2003. 23:4984–4995.
36. Price RH, Jr., Handa RJ.: Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat. *Neurosci. Lett.*, 2000. 288:115-118.
37. Jakab RL, Wong JK, Belcher SM.: Estrogen receptor beta immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 2001. 430:396-409.
38. Somogyi V, Györffy A, Scalise TJ, Kiss DS, Goszleth G, Bartha T, Frenyó VL, Zsarnovszky A: Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen and insulin. *Nutr Res Rev.*, 2011. 22:1-23.
39. Toth I, Goszleth G, Frenyó VL.: The major regulators of feed-intake: ghrelin, leptin and their interactions. *Magyar Állatorvosok Lapja.*, 2012. 8:504-512.
40. Kiss DS, Jocsak G, Zsarnovszky A.: The role of insulin in the central regulation of feed-intake. *Magyar Állatorvosok Lapja.*, 2012. 10:635-640.
41. Somogyi V, Györffy A, Bartha T.: The role of estrogen and thyroid hormones in the regulation of feed-intake. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 2012, közlésre elfogadva.
42. Franklyn JA, Sheppard MC, Ramsden DB.: Serum free thyroxine and free triiodothyronine concentrations in pregnancy. *BMJ.*, 1983. 287:394.
43. Zhu YS, Yen PM, et al.: Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996. 93:12587–12592.
44. Bauer M, Whybrow PC.: Thyroid hormone and mood modulation: new insights from functional brain imaging techniques. *Curr. Psychiatry Rep.*, 2003. 5:163–165.
45. Dellovade TL, Kia HK, et al.: Thyroid hormone coadministration inhibits the estrogen-stimulated elevation of preproenkephalin mRNA in female rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology.*, 1999. 70:168–174.
46. Scott RE, Wu-Peng XS, et al.: Interactions of estrogen- and thyroid hormone receptors on a progesterone receptor estrogen response element (ERE) sequence: a comparison with the vitellogenin A2 consensus ERE. *Mol. Endocrinol.*, 1997. 11:1581–1592.
47. Adan RA, Cox JJ, et al.: Thyroid hormone regulates the oxytocin gene. *J. Biol. Chem.*, 1992. 267:3771–3777.
48. Fitts JM, Klein RM, Powers AC.: Estrogen and tamoxifen interplay with T3 in male rats: pharmacologically distinct classes of estrogen responses affecting growth, bone, and lipid metabolism, and their relation to serum GH and IGF-I. *Endocrinology.*, 2001. 142:4223–4235.

49. Larsen PR.: Update on the human iodothyronine selenodeiodinases, the enzymes regulating the activation and inactivation of thyroid hormone. *Biochem. Soc. Trans.*, 1997. 25:588–592.
50. Glass CK, Holloway JM, et al.: The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell.*, 1988. 54:313–323.